

Abstract

Necroptosis is an inflammatory form of regulated cell death implicated in various human pathologies, including neurodegenerative disorders, cardiovascular diseases, and cancer. Its execution relies on the pseudokinase Mixed Lineage Kinase Domain-Like protein (MLKL), whose regulatory mechanisms remain incompletely understood. Here, we demonstrate that alternative splicing-mediated retention of a short amino acid microexon into the C-terminal α -helix (Hc) of MLKL disrupts its cell-killing function, producing a necroptosis-deficient isoform that antagonizes the activity of the necroptosis-proficient isoform in both mice and humans. This necroptotic inactive isoform naturally forms oligomeric complexes and associates with membranes but is unable to undergo RIPK3-dependent phosphorylation. It interacts with the active isoform, likely through the same oligomerization interface, changing crucial aspects like its interaction with RIPK3 and its oligomerization behavior, leading to defective necroptotic signaling and subsequent membrane permeabilization.

Using advanced microscopy, we further uncovered that the membrane-association dynamics of the necroptosis-proficient isoform show increased membrane residency and reduced mobility during necroptosis. Stoichiometry analysis revealed that the active isoform undergoes a shift toward higher-order oligomers upon cell death induction, in contrast to the anti-necroptotic one, which appeared as single units at the membrane in both healthy and necroptotic cells. Co-expression of the isoforms alters the cellular distribution of the oligomerization pattern of the active one, probably sequestering it into inactive complexes at the membrane. These findings support a model in which alternative splicing generates an anti-necroptotic MLKL isoform that fine-tunes necroptosis execution by modulating the activation and oligomerization dynamics of its necroptotic counterpart.

Abstrakt

Die Nekroptose ist eine entzündliche Form des regulierten Zelltods, die bei verschiedenen menschlichen Erkrankungen wie neurodegenerativen Leiden, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs eine Rolle spielt. Ihre Ausführung hängt von der Pseudokinase Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL) ab, deren Regulation noch nicht vollständig verstanden ist. Wir zeigen, dass durch alternatives Spleißen ein kurzes Aminosäure-Microexon in die C-terminale α -Helix (Hc) von MLKL eingefügt wird, wodurch seine zelltötende Funktion verloren geht. Diese Variante erzeugt eine nekroptose-defiziente Isoform, die die Aktivität der normalen, nekroptose-fähigen Isoform bei Maus und Mensch hemmt. Die inaktive Isoform bildet natürliche Oligomere und bindet an Membranen, kann jedoch nicht durch RIPK3 phosphoryliert werden. Sie interagiert mit der aktiven Isoform, vermutlich über dieselbe Oligomerisierungsoberfläche, und verändert dadurch deren Interaktion mit RIPK3 sowie ihr Oligomerisierungsverhalten. Dies führt zu einer gestörten Signalübertragung und eingeschränkter Membranpermeabilisierung.

Mikroskopische Analysen zeigten, dass die aktive Isoform während der Nekroptose eine erhöhte Membranverweildauer und verringerte Mobilität aufweist. Stöchiometrische Untersuchungen ergaben, dass sie bei Zelltod-Induktion höhergeordnete Oligomere bildet, während die anti-nekroptotische Isoform als Einzelmolekül an der Membran verbleibt. Wird beide Isoformen gemeinsam exprimiert, verändert sich das Oligomerisierungsmuster der aktiven Isoform, wahrscheinlich durch deren Einbindung in inaktive Komplexe. Diese Ergebnisse stützen ein Modell, in dem alternatives Spleißen eine anti-nekroptotische MLKL-Isoform hervorbringt, die die Ausführung der Nekroptose feinreguliert, indem sie die Aktivierungs- und Oligomerisierungsdynamik ihres aktiven Gegenstücks moduliert.